

(4)

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 02-211865

(43)Date of publication of application : 23.08.1990

(51)Int.Cl.

C12N 5/06

C12M 3/00

(21)Application number : 01-031844

(71)Applicant : KAO CORP

TOKYO JIYOSHI IKA UNIV

(22)Date of filing : 10.02.1989

(72)Inventor : OKANO MITSUO
KATAOKA KAZUNORI
YAMADA NORIKO
SAKURAI YASUHISA
AMIYA TSUYOSHI
MAMADA AKIRA

(54) SUPPORT MATERIAL FOR CULTURING CELL

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain the subject material capable of readily peeling and recovering cultured and proliferated cells with a temperature change by coating the surface of a support material with a (co)polymer having the upper limit critical dissolution temperature and lower limit dissolution temperature for water within prescribed ranges.

CONSTITUTION: The objective support material for culturing cells obtained by coating the surface thereof with a (co)polymer (e.g. polyN-isopropylacrylamide) having 80–0° C upper limit critical dissolution temperature or lower limit dissolution temperature for water. The objective material treated with the above-mentioned polymer is capable of readily controlling balance in hydrophilicity and hydrophobicity of the support surface simply by changing environmental temperature and recovering proliferated cells merely by changing temperature in a cell peeling and recovering step during and after completing culturing of the cells, peeling the cultured cells and subsequently washing the peeled cultured cells with an isotonic solution, etc.

⑯ 公開特許公報 (A)

平2-211865

⑮ Int. Cl. 5

C 12 N 5/06
C 12 M 3/00

識別記号

府内整理番号

⑯ 公開 平成2年(1990)8月23日

8717-4B

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全5頁)

⑭ 発明の名称 細胞培養支持体材料

⑮ 特願 平1-31844

⑮ 出願 平1(1989)2月10日

⑯ 発明者 岡野 光夫	千葉県浦安市美浜5-4-808
⑯ 発明者 片岡 一則	千葉県柏市大室1083-4 柏ヴィレジ141-9
⑯ 発明者 山田 則子	東京都板橋区前野町6-10 前野町ハイツ1-601
⑯ 発明者 桜井 靖久	東京都杉並区永福3-17-6
⑯ 発明者 綱屋 敏之	和歌山県和歌山市舟津町2-11-3 シティーハイツアルム201号
⑯ 発明者 優田 明	和歌山県和歌山市西浜1450 花王水軒寮
⑮ 出願人 花王株式会社	東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番10号
⑮ 出願人 学校法人東京女子医科大学	東京都新宿区河田町8-1
⑮ 代理人 弁理士 青山 葵 外2名	

明細書

1. 発明の名称

細胞培養支持体材料

2. 特許請求の範囲

1. 水に対する上限臨界溶解温度または下限溶解温度が80~0℃の範囲にあるポリマーもしくはコポリマーで表面を被覆した細胞培養支持体材料。

3. 発明の詳細な説明

<産業上の利用分野>

本発明は、生物学、医学および免疫学等における細胞類の培養用支持体材料に関するものである。

<従来の技術>

従来、細胞培養は、ガラス表面上あるいは種々の処理を行なった合成高分子の表面上にて行なわれていた。例えば、ポリスチレンを材料とする表面処理、例えば γ 線照射、シリコンコーティング等を行なった種々の容器が細胞培養用容器として普及している。従来、このような細胞培養用容器を用いて培養・増殖した細胞は、トリプシンのよ

うな蛋白分解酵素や化学薬品により処理することで容器表面から剥離・回収されていた。しかしながら、上述のような化学薬品処理を施して増殖した細胞を回収する場合、①処理工程が煩雑になり、不純物混入の可能性が多くなること、②増殖した細胞が化学的処理により変成し細胞本来の機能が損なわれる例があること、等の欠点が指摘されている。

<発明が解決しようとする課題>

本発明は、上記のような問題を解決するためになされたものであり、トリプシン、EDTAのような蛋白分解酵素、化学薬品処理を施さずに環境温度を変化させることで、培養・増殖させた細胞を支持体表面から剥離・回収が可能となるような細胞培養に使用する材料を提供することを目的とする。

<課題を解決するための手段>

本研究者らは以上のような点を鑑み、鋭意研究を重ねた結果、細胞支持体の表面を水溶性高分子の中でも特に上限臨界溶解温度かつ/または下限

臨界溶解温度(水にある物質を混合する時、ある温度では部分的にしか溶かさないため、2層に分かれているが、温度を上げるかまたは下げてある一定の温度を過ぎると完全に溶解して1層になることがある。温度を上げて完全溶解に達した場合の温度を上限臨界溶解温度、温度を下げていって完全に溶解した場合の温度を下限臨界溶解温度と言う。)を示すようなポリマーにより処理することで、環境温度を変化させただけで支持体表面の親水性、疎水性のバランスを容易にコントロールでき、細胞培養中と培養終了後、細胞剥離・回収工程で温度を変化させると増殖細胞が剥離、引き続いて等張液等で洗浄することだけで増殖細胞を回収可能であることを見出した。

即ち、本発明は水に対する上限臨界溶解温度または下限溶解温度が80～0℃の範囲にするポリマーもしくはコポリマーで表面を被覆した細胞培養支持体材料を提出する。

水に対する上限または下限臨界溶解温度は通常水(イオン交換水または蒸留水)との溶解相図を作

本発明に用いるポリマーまたはコポリマーは、以下のモノマーの重合または共重合により得られる。使用し得るモノマーは、これらの化合物に限定されるものではないが、例えば、アクリルアミド、メタクリルアミド等の(メタ)アクリルアミド化合物、N-イソプロピル(メタ)アクリルアミド、N-エトキシエチル(メタ)アクリルアミド、テトラヒドロフルフリル(メタ)アクリルアミド等のN-アクリル置換(メタ)アクリルアミド誘導体、N,N-ジメチル(メタ)アクリルアミド、N,N-エチルメチルアクリルアミド等のN,N-ジアルキル置換(メタ)アクリルアミド誘導体、1-(1-オキサ-2-プロペニル)-ビロリジン、1-(1-オキサ-2-プロペニル)-ビペリジン、4-(1-オキサ-2-プロペニル)-モルホリン、1-(1-オキサ-2-メチル-2-プロペニル)-ビロリジン、1-(1-オキサ-2-メチル-2-プロペニル)-ビペリジン、4-(1-オキサ-2-メチル-2-プロペニル)-モルホリン等のN-ヘテロ環状基置換(メタ)アクリルアミド誘導

成して求める。水との溶解相図は水と上限または下限臨界溶解温度を求めるポリマーとの種々の濃度(重量分率、容積分率、モル分率、モル比等何れの単位を用いても構わない。)の溶液を調製し、各々の温度を上下させ、①目視により2相分離を確認する方法の他、②臨界タンパク光の観測による方法、③散乱光強度の観測による方法、④透過レーザー光の観測による方法、等一般に知られている方法の何れかを用いて、また、組み合わせて用いて作成される。

被覆に用いられる物質は水溶液中で上限臨界溶解温度または下限臨界溶解温度を有する化合物であればすべて用いることができるが、好ましくは80℃～0℃、より好ましくは50℃～20℃の上限または下限臨界溶解温度を有するものである。上限または下限臨界溶解温度が80℃を越えると細胞が死滅する可能性があるので好ましくない。また、上限または下限臨界溶解温度が0℃より低いと一般に細胞増殖速度が極度に低下するか、または細胞が死滅してしまう為、好ましくない。

体、メチルビニルエーテル等のビニルエーテル誘導体また増殖細胞の種類によって臨界溶解温度を調節する必要がある場合や、被覆物質と細胞培養支持体との相互作用を高める被覆が生じた場合や、細胞支持体の親水、疎水性のバランスを調整する等の目的で、上記以外のモノマー類との共重合、ポリマー同士のグラフトまたは共重合、あるいはポリマー、コポリマーの混合物を用いてもよい。また、ポリマー本来の性質を損なわない範囲で、架橋することも可能である。

また、被覆を施される支持体の材質は通常細胞培養に用いられるガラス、改質ガラス、ポリスチレン、ポリメチルメタクリレート等の化合物のみならず、一般に形態付与が可能である物質、例えば上記以外の高分子化合物、セラミックス金属類など全て用いることができる。その形状は、ペトリディッシュに限定されることは無く、プレート、ファイバー、(多孔質)粒子、また、一般に細胞培養等に用いられる容器の形状(フラスコ等)を付与されていても構わない。

支持体への被覆方法は、支持体基材と被覆物質を①化学的な反応によって結合させる方法、②物理的な相互作用を利用する方法、を単独でまたは併用して行なうことができる。すなわち、①化学的な反応によって結合させる場合、電子線照射(EB)、 γ 線照射、紫外線照射、プラズマ処理、コロナ処理、さらに支持体と被覆材料が適当な反応性官能基を有する場合は、ラジカル反応、アニオン反応、カチオン反応等の一般に用いられる有機反応を用いることができる。②物理的な相互作用による方法としては、被覆材料単独または支持体との相溶性のよいマトリックスを媒体とし(例えば、支持体を形成するモノマーまたは支持体と相溶性のよいモノマーと被覆材料とのグラフトポリマー、ブロックポリマー等)、塗布、混練等の物理的吸着を用いる方法等がある。

また、細胞培養支持体上にて培養した細胞を支持体から剥離させ回収するには、上限臨界溶解温度以上もしくは下限臨界溶解温度以下にてこれを剥離し、等張液等によって洗浄して回収すればよ

ソプロビルアクリルアミドを電子線照射によって表面コーティングされた支持体では、温度を制御することにより支持体表面の親水・疎水性がコントロールでき細胞の細胞培養支持体への接着性が変化する。そのため、温度を変化させるだけで培養・増殖後の細胞を破壊することなく細胞支持体から容易に剥離させ、引き続いて等張液等によって培養された細胞を洗浄すると回収することが可能である。

この方法によれば、トリプシン、EDTAのような蛋白分解酵素、化学薬品による処理を軽々に細胞培養支持体から培養した細胞を剥離・回収することができるので、①処理工程が簡略化される、②不純物等の混入の可能性が完全になくなる、③増殖した細胞が化学的処理により細胞膜が障害される等で細胞本来の機能が損なわれない、等の顕著な特徴を獲得することが可能である。

<実施例>

以下、本発明を実施例により説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

い。

本発明の作用をポリ-N-イソプロピルアクリルアミドを例にとって説明する。ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドは水溶液中で約32℃に下限臨界溶解温度を有することが知られている。例えば、一般に細胞培養用ペトリディッシュ材料として用いられるポリスチレン上でN-イソプロピルアクリルアミドを電子線照射(EB)により重合を行なうと、下限臨界溶解温度である32℃以上ではポリ-N-イソプロピルアクリルアミドの占有体積は小さくなり、ポリマー中の水分子を排除するため、支持体表面は疎水性を示し、逆に32℃以下ではポリ-N-イソプロピルアクリルアミドの占有体積は大きくなるのでポリマー中の水分子の占める体積分率が上昇するため、支持体表面は親水性を示すようになる。

通常の細胞培養ではトリプシン、EDTA等の蛋白分解酵素、化学薬品で処理することにより培養・増殖後の細胞を支持体表面から剥離・回収するが、上述したような物性を有するポリ-N-イ

実施例1、2、3

細胞支持体基材としてベクトン・ディキンソン・ラブウェア(Becton Dickinson Labware)社製ファルコン(FALCON)3001ペトリディッシュを用い、培養する細胞は牛の大動脈の血管内皮細胞を採用した。(ポリ)N-イソプロピルアクリルアミド(被覆物質)を表-1に示す濃度でイソプロピルアルコールに溶解してペトリディッシュに0.5ml添加後、各々表-1に示す照射量の電子線を照射することによりペトリディッシュ表面にポリ-N-イソプロピルアクリルアミドを被覆した。電子線照射終了後、イオン交換水によりペトリディッシュを洗浄し、残存モノマーを取り除きクリーンベンチ内で乾燥して、細胞支持体を得た。

牛の大動脈の血管内細胞の培養は、得られた細胞支持体上にて牛胎児血清(FCS)を20%含むダルベッコー改変イーグル培地(DMEM)を培地として5%二酸化炭素中、37℃で行なった。充分細胞が増殖したのを確認後、4℃に冷却し放置

して付着培養細胞を剥離させ、増殖細胞剥離回収率(すなわち、増殖させた細胞総数に対する剥離して回収された細胞総数)を求めた。結果を表-1に示す。

実施例4、5

被覆物質として(ポリ)N-イソプロピルアクリルアミドの代わりにN,N-ジエチルアクリルアミドを使用した点以外は実施例1、2、3と同様にして細胞支持体を得、細胞培養し、これを剥離回収した。増殖細胞剥離回収率を表-1に示す。

比較例1、2、3

細胞支持体としてベクトン・ディキンソン・ラブウェア社製ファルコン3001ペトリディッシュを用い、比較例1は全く表面処理を行なわずに実施例1、2、3、4、5と同様の実験を行なった。また、比較例2、3は電子線照射のみを行ない、実施例1、2、3、4、5と同様の実験を行なった。牛の大動脈の血管内皮細胞の培養は実施例1、2、3、4、5と同様の方法を採用した。統いて、充分細胞が増殖したのを確認後、4°Cに冷却し放

(CA-D型)[協和界面科学株式会社製]および付属品として三態系測定装置を用い水中法(under water method)で接触角を測定した。結果を表-2に示す。

表-2

	36°Cにおける接觸角(°)	4°Cにおける接觸角(°)
実施例1	42	25
実施例2	48	28
実施例3	36	22
実施例4	44	24
実施例5	46	26
比較例1	58	64
比較例2	56	62
比較例3	56	62

実施例6

実施例3で得られた剥離細胞の損傷度合を確認するため、これを遠心分離(600G、5分)により回収し、得られた 1×10^6 個の細胞をベクトン・ディキンソン・ラブウェア社製ファルコン3

置して付着培養細胞を剥離させ、増殖細胞剥離回収率を求めた。結果を表-1に示す。

表-1

	モノマーもしくはポリマーの濃度 ミトモ/マ-1 wt%	電子線照射量 (メガレット)	増殖細胞剥離回収率
実施例1	N-イソプロピルアクリルアミド ミトモ/マ-1 wt%	5	> 90 %
実施例2	N-イソプロピルアクリルアミド ミトモ/マ-1 wt%	5	> 90 %
実施例3	N-イソプロピルアクリルアミド ミトモ/マ-10 wt%	2.5	> 90 %
実施例4	N,N-ジエチルアクリルアミド ミトモ/マ-1 wt%	5	> 90 %
実施例5	N,N-ジエチルアクリルアミド ミトモ/マ-10 wt%	5	> 90 %
比較例1	0	0	全く剥離せず回収不可能
比較例2	0	5	全く剥離せず回収不可能
比較例3	0	2.5	全く剥離せず回収不可能

なお、実施例、比較例とも、支持体の親水・疎水性を調べるためにフェース(FACE)接觸角計

001ペトリディッシュ上で再び培養させた。培養は実施例1、2、3と同様の方法を採用した。結果を表-3に示す。

比較例4

比較例1で培養した付着細胞を0.05%トリプシン-0.02%EDTA処理し、剥離させた細胞の損傷度合を確認するため、これを遠心分離(600G、5分)することにより回収し、得られた 1×10^6 個の細胞をベクトン・ディキンソン・ラブウェア社製ファルコン3001ペトリディッシュ上で再び培養させた。培養は実施例1、2、3と同様の方法を採用した。結果を表-3に示す。

表-3

	培養開始時の細胞数	4日後の細胞数
実施例6	1×10^6	1×10^6
比較例4	1×10^6	5×10^6

以上の実施例および比較例の結果より、細胞培養支持体基材であるポリスチレンの表面をN-イソプロピルアクリルアミドポリマーまたはN,N-ジエチルアクリルアミドで表面処理を行なった

実施例1、2、3、4、5では表-2に示されるように周囲の温度を36℃から4℃に下げることで接触角が減少しており、これは被覆されたN-イソプロピルアクリルアミドまたはN,N-ジエチルアクリルアミドにより材料表面が疎水性から親水性へと変化していることを示している。このような材料を使用した実施例1、2、3、4、5の場合、表-1に示されるように、培養温度を低下させると付着細胞は培養支持体から良好に剥離し、回収することが可能であった。

一方、表面処理を施さない場合は表-2に示されるように、周りの温度を下げても接触角はほとんど変化せず材料表面は疎水性のままであった。このような材料を使用した比較例1、2、3では表-1に示されるように、培養温度を低下させても付着細胞の剥離現象は観察されなかった。

さらに、剥離回収細胞の損傷度合については、表-3に示されるように、実施例6では培養開始時の10倍まで増殖させることができあるが、比較例4では5倍までしか増殖させることができ

きなかった。このことは、本発明の剥離回収細胞は従来のそれよりも損傷度が小さいことを意味する。

<発明の効果>

本発明は、低温処理という簡単な操作で、不純物等を全く混入させることなく、しかも、従来の方法と比較すると細胞機能を十分に保持しながら、培養・回収の繰り返し操作を行なうことができる。

特許出願人 花王株式会社

学校法人 東京女子医科大学

代理人 弁理士 青山 葵ほか2名

平成 2.11.20 発行
手続補正書

平成 2年 6月20日(通)

特許法第17条の2の規定による補正の掲載

平成 1 年特許願第 31844 号 (特開平
2-211865 号, 平成 2 年 8 月 23 日
発行 公開特許公報 2-2119 号掲載) につ
いては特許法第17条の2の規定による補正があつ
たので下記のとおり掲載する。 1 (1)

Int. C1.	識別 記号	庁内整理番号
C12N 5/06		
C12M 3/00		8717-4B

特許局長官殿

1. 事件の表示

平成 1 年 特許願 第 031844 号

2. 発明の名称

細胞培養支持体材料

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 (091) 花王株式会社

(他 1 名)

4. 代理人

住所 〒540 大阪府大阪市中央区城見2丁目1番61号
ツイン21 MIDタワー内 電話(06)949-1261

氏名 弁理士 (6214) 青山 葵



5. 補正命令の日付

自 発 (審査請求と同時)

6. 補正の対象

明細書の「特許請求の範囲」および
「発明の詳細な説明」の欄

2. 6.21

7. 補正の内容

(1)特許請求の範囲を別紙の通り訂正する。

(2)明細書第3頁下から5行、「下限」の後に「臨
界」を挿入する。

(3)同第5頁第4行～第6頁第2行、「例えば
……誘導体また」とあるを「例えば、アクリルア
ミド、メタクリルアミド等の(メタ)アクリルアミ
ド化合物、N-エチルアクリルアミド(単独重合
体の下限臨界溶解温度72°C)、N-n-プロピル
アクリルアミド(同21°C)、N-n-プロピルメ
タクリルアミド(同27°C)、N-イソプロピルア
クリルアミド(同32°C)、N-イソプロピルメタ
クリルアミド(同43°C)、N-シクロプロピルア
クリルアミド(同45°C)、N-シクロプロピルメ
タクリルアミド(同60°C)、N-エトキシエチル
アクリルアミド(同約35°C)、N-エトキシエチ
ルメタクリルアミド(同約45°C)、N-テトラヒ
ドロフルフリルアクリルアミド(同約28°C)、N
-テトラヒドロフルフリルメタクリルアミド(同
約35°C)等のN-アルキル置換(メタ)アクリル

アミド誘導体、N,N-ジメチル(メタ)アクリル
アミド、N,N-エチルメチルアクリルアミド(單
独重合体の下限臨界溶解温度56°C)、N,N-ジ
エチルアクリルアミド(同32°C)等のN,N-ジ
アルキル置換(メタ)アクリルアミド誘導体、更に
1-(1-オキソ-2-プロペニル)-ビロリジン
(同56°C)、1-(1-オキソ-2-プロペニル)
-ビペリジン(同約6°C)、4-(1-オキソ-2
-プロペニル)-モルホリン、1-(1-オキソ-
2-メチル-2-プロペニル)-ビロリジン、1
-(1-オキソ-2-メチル-2-プロペニル)-
ビペリジン、4-(1-オキソ-2-メチル-2
-プロペニル)-モルホリン等の環状基を有する(メ
タ)アクリルアミド誘導体、メチルビニルエーテ
ル(単独重合体の下限臨界溶解温度35°C)等のビ
ニルエーテル誘導体、また」に訂正する。

(4)同第6頁第4行、「被覆」とあるを「必要」に
訂正する。

(5)同第6頁第13行、「化合物」とあるを「物
質」に訂正する。

平成 2.11.20 発行

(6) 同第6頁第1~5行、「セラミックス」の後に句点を挿入する。

(7) 同第13頁表-2最上欄、「36°C」とあるを「37°C」に訂正する。

(8) 同第13頁表-2と表-2の下第1行との間に以下の文章を挿入する。

「実施例6

被覆物質として(ポリ)N-イソプロピルアクリルアミドの代わりにN-イソプロピルメタクリルアミドを使用した点以外は実施例1、2、3と同様にして細胞支持体を得、牛の大動脈の血管内皮細胞を45°Cで培養し、これを30°Cで剥離回収した。増殖細胞剥離回収率を表-3に示す。

「実施例7

被覆物質として(ポリ)N-イソプロピルアクリルアミドの代わりにN-n-プロピルアクリルアミドを使用した点以外は実施例1、2、3と同様にして細胞支持体を得、牛の大動脈の血管内皮細胞を25°Cで培養し、これを10°Cで剥離回収した。増殖細胞剥離回収率を表-3に示す。

「表-4」に訂正し、「実施例6」とあるを「実施例8」に訂正する。

以上

表-3

	モノマー濃度	電子線 照射量 (マガラード)	増殖細胞 剥離回収率
実施例6	N-イソプロピルメタクリルアミド 10wt%	25	>90%
実施例7	N-n-プロピルアクリルアミド 10wt%	25	>90%

(9) 同第13頁表-2の下第1行、「実施例6」とあるを「実施例8」に訂正する。

(10) 同第14頁第3行、第12行および第13行、「表-3」とあるを全て「表-4」に訂正する。

(11) 同第14頁表中、「実施例6」とあるを「実施例8」に訂正する。

(12) 同第15頁第2行、「36°C」とあるを「37°C」に訂正する。

(13) 同第15頁第10行、「可能であった。」の後に「また、実施例6及び実施例7においても同様の結果が得られた。」を挿入する。

(14) 同第15頁下から3行、「表-3」とあるを

[別 紙]

特許請求の範囲

1. 水に対する上限臨界溶解温度または下限臨界溶解温度が80~0°Cの範囲にあるポリマーもしくはコポリマーで表面を被覆した細胞培養支持体材料。